

⑨ Int. Cl.
C 12 d 13/02
C 07 c

⑩ 日本分類
36(2) D 32
36(2) C 04
16 C 44

⑪ 日本国特許庁

⑫ 特許願 公告

昭48-8836

特 許 公 報

⑬ 公告 昭和48年(1973)3月17日

発明の数 1

(全4頁)

1

⑭ 微生物による助酵素 Q_{10} の製造法

⑮ 特 願 昭45-27329

⑯ 出 願 昭45(1970)3月31日

(特許法第30条第1項適用 日本農芸化学会 5
昭和45年度大会講演要旨集(昭和45年3月
10日発行)に発表)

⑰ 発 明 者 近藤圭二

磐田市見付4300

同 山田雄三

同所

同 光木浩司

横浜市旭区中沢町56

⑱ 出 願 人 味の素株式会社

東京都中央区京橋1の6

⑲ 代 理 人 弁理士 田淵権

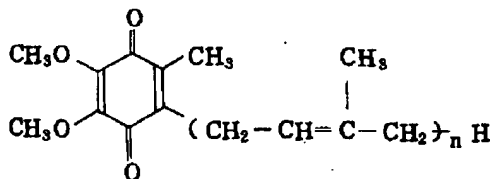
発明の詳細な説明

本発明は助酵素 Q_{10} の製造法に関するものであり、その目的とするところは、ロドトルラ、クリプトコッカス、スポロボロミセス属酵母を培養することにより、菌体中に助酵素 Q_{10} を生成蓄積させ、さらに必要に応じてこれを抽出、単離することにある。

助酵素 Q_{10} は広く動植物界に分子、末梢電子伝達系の必須成分として重要な役割を果たすが、最近本物質が各種疾病に対し、すぐれた薬理作用、生理作用を呈することが明らかになりつつある。

助酵素 Q_{10} は天然物すなわち動植物体から抽出製造されているため極めて高価である。

助酵素 Q_n の一般式は



2

で示される同族体の総称であるが、微生物界に動植物同様 $n=10$ の助酵素 Q_{10} を含有することが知られているものとしては、シュードモナス・デニトリフィカンス、アグロバクテリウム・トウメファシエンス、光合成細菌であるロドスピリウム、ロドシュードモナス、ロドミクロビウム属細菌のほかに、ノイロスボラ・クラッサ、アスペルギルス・フミガートス、ジベレラ・フジクロイの糸状菌に限られている。

10 一方、その他の細菌、糸状菌、酵母菌には助酵素 Q_{6-9} ($n=6\sim 9$)が知られているが、酵母菌としてはサツカロミセス・セルビシイエに助酵素 Q_6 、トルラ酵母に同 Q_7 (以上T. Ramasarma: Advance in lipid Research 6, 107
15 (1968))、キャンディダ・トロピカリス pK 233には同 Q_8 が存在する(清水ら: 酸酵工学雑誌 47, 542(1969))ことが知られているに過ぎない。したがって、酵母菌に動植物同様の助酵素 Q_{10} の存在が発見されたのは本発明が最初である。

本発明によつて酵母菌から助酵素 Q_{10} を製造する場合の特徴は次のごとくである。

(1) 従来、動植物体から本物質を単離する方法に較べて、本物質含有酵母は、短時間で、しかも大規模に好気培養して得られるから製造コストも大幅に安価になる。

(2) 本物質を含有する酵母は、助酵素 Q_{10} を含有する細菌の培養、及び菌体分離に較べて、菌体生産量が多くかつ分離が容易であり、助酵素 Q_{10} を単離する場合にも不純物少く工程が簡単である。

本発明者らは、各種酵母菌体を培養し、菌体中の助酵素 Q_n を分離し、その中から同 Q_{10} のみを含有する菌種を調べたところ第1表に示すごとく
35 ロドトルラ、クリプトコッカス、スポロボロミセス属菌種に特異的に分布することを見出し、本発明を完成した。

第 1 表
助酵素 Q₁₀ 生産菌と含有量

菌 種	助 酵 素 Q	
	同族体 n =	m/g 乾燥菌 体 g
ロドトルラ・フラバ IFO 1193	10	0.25
ロドトルラ・グルチニス AJ 5015	10	0.21
ロドトルラ・ルブラ AJ 5314 (工発研菌寄 第 632 号)	10	0.32
ロドトルラ・ピネアウス IFO 930	10	0.22
ロドトルラ・バリダ AJ 5017	10	0.24
ロドトルラ・マリナ AJ 5014	10	0.21
ロドトルラ・テキセンシス AJ 5019	10	0.19
クリプトコッカス・ネオブ オルマンズ AJ 4289 (工発研菌寄第 631 号)	10	0.35
クリプトコッカス・アルビ ダス AJ 4297	10	0.23
クリプトコッカス・ローレ ンテ AJ 5225	10	0.20
クリプトコッカス・テレウ ス AJ 5021	10	0.19
クリプトコッカス・ルテオ ルス IFO 611	10	0.15
スボロポロミセス・ロゼウ ス IFO 1031	10	0.36
スボロポロミセス・バラロ ゼウス IFO 1103	10	0.34
スボロポロミセス・サルモ ニカラー IFO 374	10	0.35
スボロポロミセス・グラシ リス IFO 1033 (工発 研菌寄第 633 号)	10	0.31

実験方法

上記菌株をグルコース 1%、酵母エキス 0.2%、
ポリペプトン 0.3%、含有培地 50 ml / 500 ml
振盪フラスコ (pH 6.0) に接種し、26~27
5 °C で 24~36 時間好氣的培養を行い、常法通り
菌体を遠心沈降し、生菌体を採取する。得られた
生菌体を出発物質とし、助酵素 Q₁₀ の定性、定量
を行つた。

生菌体 20~30 g を 30 ml の水に懸濁し、メ
10 タノール 80 ml、ピロガロール 3 g、苛性ソーダ
16 g、水 20 ml を含有する溶液を添加し、湯浴
の温度 80~90 °C の下で還流加熱抽出を行う。
約 30 分放冷後、抽出液に 80 ml の n-ヘキサン
を添加し抽出を行う。この操作を後 2 回繰返し、
15 n-ヘキサン層を数回水洗する。水洗済ヘキサン
層に無水芒硝を添加し、脱水後減圧下に n-ヘキ
サンを溜去する。残渣に 10 ml のアセトンを添加
し、得られたアセトン可溶部を再度減圧濃縮して
残渣を得る。これを少量のアセトンに溶解し、常
20 法通り、シリカゲルの薄層に塗布し、ベンゼンで
展開する。本操作で R_f 値の高いカロチノイド色
素と助酵素 Q₁₀ は分離出来る。以上の操作によつ
て得られた助酵素 Q_n 画分を定量的に削り取り、
次の定性、定量を行う。

25 助酵素 Q 同族体の定性法は、本物質画分をアセ
トンで抽出し、クロマトグラフィーにかける。す
なわち、シリコン KF-54 (信越化学) 3%
(W/V) のクロロフォルム溶液に東洋濾紙 (No
50) を浸漬、乾燥液、助酵素 Q_n 同族体 n=6
30 ~10 を標準物質とし、次の溶媒で展開する。

① エタノール-エチレンアセテート-水 (5:
3:1, V/V)

② n-プロパノール-水 (4:1, V/V)

③ アセトン-水 (5:1, V/V) を用いる。

35 また、局方白色ワセリン 2.5% (W/V) のト
ルエン溶液に浸漬した濾紙を固定相として

④ N・N-ジメチルフォルムアミド-水 (97:
3)

溶媒で展開すると同族体の R_f 値は次の如くであ
40 る。

5

助酵素Q _n	溶 媒 の 種 類			
	①	②	③	④
n = 6	0.82	0.80	0.34	0.81
n = 7	0.74	0.73	0.24	0.70
n = 8	0.65	0.67	0.16	0.58
n = 9	0.56	0.60	0.10	0.45
n = 10	0.46	0.53	0.06	0.29

なお、溶媒1〜3で展開したものは何れも0.3%の過マンガン酸カリのメタノール溶液に展開濾紙を浸漬し、直ちに水洗すると助酵素Q同族体は白地に褐色のスボットとして検出され、また、溶媒4で展開した場合は紫外線ランプの下で直接検出出来る。

一方、助酵素Q₁₀の定量法としては、上記薄層クロマトの本物質面分をアセトンで溶出し、Folkenらの方法(Archives of Biochemistry and Biophysics 87, 298 (1960))に準じて行つた。すなわち、アセトン溶出物を10mlのエタノールに溶解し、4mlのエタノール溶液に1mlのエチルシアノアセテート、1mlの0.2規定KOH溶液を添加し、8分間発色させる。これを分光光度計の625mμにて吸光値を測定する。一方対照は4mlのエタノール溶液に1mlのエタノールと、1mlの0.2規定KOH溶液を添加し、検液同様8分後に625mμの吸光値を測定する。検液の吸光値から対照値を差引き、助酵素Q₁₀の標準定量曲線から定量した。

本発明における上記酵母菌によつて助酵素Q₁₀製造の要旨を説明すると次のごとくである。

まず、グルコース、澱粉加水分解物などの糖類、酢酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸などの有機酸類、メタノール、エタノール、プロパノールなどのアルコール類、さらには、これら酵母の資化し得る各種化成品類、液状ないし、ガス状の炭化水素などを炭素源とし、アミノ酸類、ポリペプトン、大豆蛋白抽出物、大豆蛋白抽出時副生する大豆ホエー、尿素、硫安、塩安、リン酸アンモンなどの有機または無機窒素源とし、これに酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、コーンスナープリツカー、ビタミン含有物などの栄養物質を含有する培地(pH 3〜8)に菌株を接種し、20〜36℃にて10〜50時間、好氣的に通気、攪拌培養

6

する。培養液から常法通り遠心法、または濾過法などで菌体を分離し、水洗する。

ここで得られた菌体中には、助酵素Q₁₀を豊富に含有するので、本菌体を適当に処理した後、菌体と共に助酵素Q₁₀を栄養剤、医薬に供することも出来る。また助酵素Q₁₀単離のための出発物質である菌体は生菌体または乾燥菌体、菌体処理物のいずれでも使用出来る。その場合、先ず菌体内でリン脂質類と結合している助酵素Q₁₀を分離するために鹼化抽出を行う必要がある。エタノール、メタノールなどの低級アルコール、苛性ソーダ、ピロガロールの混液を菌体含有液に添加し、80〜90℃にて1時間程度還流加熱抽出する。次いで本抽出液を静かに冷却し、n-ヘキサンあるいは軽油のごとき溶媒で抽出し、不溶物と分別する。得られた溶媒層を数回水洗し、溶媒層を無水芒硝にて脱水後、減圧濃縮、乾固し、これを少量のアセトンに溶解する。これをシリカゲルカラムに添加し、ベンゼンなどで展開すると先ず、カロチノイド色素が溶離し、次いで黄色の助酵素Q₁₀が溶出して来る。本面分を集めて減圧下に溶媒を溜去後残渣のエタノール可溶部分を冷却放置すると黄色の助酵素Q₁₀の粗結晶が得られる。本物質の再結晶を繰返すと黄色板状結晶が得られる。

得られた助酵素Q₁₀の元素分析、融点、UVスペクトル分析の結果は標品のそれに一致し、さらにN.M.R.、質量分析スペクトルによつて助酵素Q同族体を識別出来、これらについても同Q₁₀であることを確認した。

実施例 1

グルコース5%、ポリペプトン0.5%、酵母エキス0.2%を含有する培地(pH 6.0)1ℓを5ℓ容三角フラスコに分注し、120℃、10分加熱殺菌後、予め同上培地で25℃、20時間前培養したロドトルフ・ルブラAJ 5314培養液50mlを接種し25℃、30時間振盪培養する。本法で得られた総計10ℓの培養液を常法通り連続遠心分離によつて生菌体ペーストを得、水で一度洗滌後、再度遠心分離によつて菌体125gを調製する。得られた生菌体を120mlの水に懸濁し、これにメタノール240ml、ピロガロール12g、苛性ソーダ64gに80mlの水を加えて菌体懸濁液に添加後、85℃、1時間還流加熱する。放冷後、菌体残渣を遠心除去し、抽出液に

320mlのn-ヘキサンを添加し、分液ロートにて抽出する。本操作を3回繰返し、n-ヘキサン層を集めて、これを100mlの水にて3回水洗する。n-ヘキサン層に無水芒硝50gを添加し脱水後、溶媒層を減圧下に濃縮乾固する。残渣に40mlのアセトンを添加し、可溶部分を採取し、減圧下にアセトンを溜去して、再度5mlのアセトンに溶解する。一方、シリカゲルカラム(200ml)をベンゼンで洗滌後、上記アセトン溶液をカラム上に注加し、ベンゼンにて溶出を行う。溶出液約380ml附近にカロチノイド色素画分が溶出され、次いで溶出して来る黄出画分150mlを集め、これを減圧下に濃縮乾固する。残渣を5mlのエタノールに溶解し、冷蔵庫中で2日冷却すると黄色の粗結晶が得られる。エタノールで粗結晶の再結を2回繰返したところ黄色の板状結晶2.7mgが得られた。

本結晶のクロマトグラフィーによるRf値は助酵素Q₁₀の標準品のそれに一致し、又、融点は48.5℃であつた。本物質エタノール溶液の紫外20部吸収スペクトルλ_{max}は275mμにあり、E_{1%}^{1cm}(275mμ)は165であつて標準品と

良く一致した。

又、アセトン溶液について質量分析スペクトルを測定したところ、m/e 862に親ピーク(分子イオンピーク)が認められ、助酵素Q₁₀標品と一致した。

実施例 2

グルコース5%、ポリペプトン1%、大豆蛋白質分解液1%、コーンステープリカー1%を含有する培地(pH 6.0)で、実施例1に準じてスボロボロミセス・ロゼウスIFO 1037を接種、好氣的培養したところ培地10ℓより生菌体160gが得られた。

実施例1と同じ条件で助酵素Q₁₀を抽出単離した結果、3.5kgの結晶が得られた。

本結晶の諸性質は実施例1同様助酵素Q₁₀のそれに一致した。

⑦特許請求の範囲

1 ロドトルラ・クリプトコックス、スボロボロミセス属に属し、助酵素Q₁₀を生産する能力を有する酵母を栄養培地に培養して助酵素Q₁₀を生成せしめ、これを採取することを特徴とする助酵素Q₁₀の製造法。